

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI  
“FEDERICO II”**



**FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA**

**Dottorato di Ricerca in  
Fisiopatologia Clinica e Medicina Sperimentale  
XXV Ciclo**

Coordinatore: Prof. Gianni Marone

Tesi di Dottorato

**RUOLO DELLE IMMUNOGLOBULINE CIRCOLANTI  
NELLA REGOLAZIONE  
DELLA FUNZIONE ENDOTELIALE**

**TUTOR**

**Prof. Luigi Saccà**

**CANDIDATO**

**Dott. Antonio Ruvolo**

## **INDICE**

<b>I. INTRODUZIONE</b>	<b>Pag. 4</b>
<b>II. MATERIALI E METODI</b>	<b>Pag. 23</b>
<b>1. <i>Studio in vivo</i></b>	<b>Pag. 23</b>
<b>a) Soggetti</b>	<b>Pag. 23</b>
<b>b) Procedure Sperimentali</b>	<b>Pag. 24</b>
<b>c) Calcoli</b>	<b>Pag. 28</b>
<b>d) Analisi Statistica</b>	<b>Pag. 29</b>
<b>e) Risultati</b>	<b>Pag. 29</b>
<b>2. <i>Studio in vitro</i></b>	<b>Pag. 31</b>
<b>a) Modelli sperimentali</b>	<b>Pag. 32</b>
<b>b) Procedure sperimentali</b>	<b>Pag. 33</b>
<b>c) Risultati</b>	<b>Pag. 35</b>
<b>III. DISCUSSIONE</b>	<b>Pag. 38</b>

<b>IV. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>Pag. 43</b>
<b>V. LEGENDA DELLE FIGURE</b>	<b>Pag. 59</b>
<b>VI. TABELLE</b>	<b>Pag. 62</b>
<b>VII. FIGURE</b>	<b>Pag. 63</b>

## **I. INTRODUZIONE**

Negli ultimi anni particolare interesse si è sviluppato intorno al ruolo svolto dalle cellule endoteliali nella genesi della placca aterosclerotica. L'aterosclerosi può essere definita come una patologia infiammatoria cronica della parete vasale di arterie di medio e grosso calibro. Essa rappresenta il più comune processo patologico implicato nella genesi delle maggiori malattie cardiovascolari. L'evento iniziale sembra essere rappresentato per lo più da una disfunzione endoteliale, in seguito alla quale si innesca un processo infiammatorio accompagnato e sostenuto dall'attivazione della risposta immunitaria. Numerosi componenti dei sistemi vascolare, metabolico ed immune concorrono alla formazione della placca aterosclerotica, in particolare lipoproteine a bassa densità (LDL), cellule muscolari lisce, cellule endoteliali, leucociti e macrofagi. <sup>[1,2]</sup>

Le cellule endoteliali rappresentano un sistema complesso e dinamico capace di rispondere a stimoli di diversa natura, disponendo di un ampio patrimonio di recettori e della capacità di

produrre una serie di sostanze in grado di agire a molteplici livelli. Le funzioni del normale endotelio includono il controllo della trombosi e della trombolisi, la produzione di molecole di adesione, la regolazione della risposta infiammatoria, la proliferazione cellulare e la regolazione del tono endoteliale.

Da tali premesse emerge che le cellule endoteliali costituiscono un vero e proprio organo endocrino-autocrino-paracrino. [3, 4]

La prima delle funzioni endoteliali ad essere scoperta è stata la regolazione del tono vasale. Essa si realizza soprattutto attraverso la produzione di ossido nitrico (NO), una piccola molecola di gas solubile sintetizzato per deaminazione della L-arginina ad opera di un enzima costitutivo chiamato NO-sintetasi (NOS) [5]. Esistono tre diverse isoforme di NOS: la NOS endoteliale (eNOS), la NOS inducibile (iNOS), la NOS neuronale (nNOS). La eNOS è espressa a livello endoteliale, in particolare, nei vasi coronarici ed endocardici, nonché nei cardiomiociti e nelle cellule dei nodi seno-atriale ed atrio-ventricolare. Essa è calcio-dipendente: viene attivata da molecole che aumentano il

calcio intracellulare come l'acetilcolina, la bradichinina, la trombina, etc.

La iNOS, enzima calcio-indipendente, non è espressa costitutivamente, ma è attivata da stimoli quali citochine e prodotti microbici; la sua espressione è stata identificata a livello delle cellule infiammatorie, delle cellule endoteliali coronariche ed endocardiche, delle cellule muscolari lisce, dei fibroblasti e dei cardiomiociti.

La nNOS è espressa esclusivamente all'interno dei gangli parasimpatici intracardiaci e in neuroni del sistema autonomo <sup>[6]</sup>. A causa della sua breve emivita (6-7 sec), l'NO agisce in modo paracrino sulle cellule bersaglio attraverso l'induzione di guanosin-monofosfato ciclico (GMPc), che a sua volta dà inizio ad una cascata di eventi intracellulari che generano una risposta, come il rilassamento delle cellule muscolari lisce.

Tali cellule non sono le uniche responsive all'azione dell'NO; quest'ultimo, infatti, è in grado di agire in senso protettivo anche su altri componenti attivi del processo aterosclerotico, quali piastrine, monociti e molecole di adesione <sup>[7]</sup>.

Di recente scoperta è la capacità da parte dell'ossido nitrico di agire da *scavenger* di radicali liberi dell'ossigeno (ROS), nonché di indurre modifiche post-trascrizionali in alcune proteine attraverso la S-nitrosilazione <sup>[8, 9]</sup>.

Le molteplici funzioni svolte dall'NO nel compartimento vasale ed interstiziale rendono il ruolo di questa piccola molecola fondamentale nel mantenimento dell'omeostasi vascolare, ed è evidente, quanto alterazioni della sua produzione, possano contribuire a minare tale equilibrio in senso disfunzionale. Il nesso biologico tra disfunzione endoteliale ed aterosclerosi sembra essere costituito proprio da una diminuita biodisponibilità di NO a livello arterioso, che predispone ad un'aumentata adesione di leucociti e piastrine, alla vasocostrizione e alla proliferazione delle cellule muscolari lisce <sup>[10]</sup>. Una interessante metanalisi ha inoltre dimostrato come polimorfismi del gene codificante la eNOS, verosimilmente associati ad una ridotta produzione di NO, siano associati ad una aumentata suscettibilità allo sviluppo di aterosclerosi e cardiopatia ischemica <sup>[11]</sup>.

L'ossido nitrico non è il solo prodotto endoteliale in grado di regolare il tono vasomotore; altre sostanze prodotte

dall'endotelio sono capaci di agire sulle cellule muscolari lisce modificandone il tono in senso vasodilatante o vasocostrittore. Le sostanze vasodilanti sono rappresentate dalla prostaciclina e dal “fattore iperpolarizzante endoteliale”, una sostanza la cui natura è ancora sconosciuta <sup>[12]</sup>. Quest'ultimo, agendo in maniera NO-indipendente, determina l'iperpolarizzazione della cellula muscolare liscia attraverso un aumento della conduttanza allo ione  $K^+$ , costituendo, quindi, una via di regolazione alternativa a quella NO-mediata nel caso in cui quest'ultima sia deficitaria <sup>[13, 14]</sup>. La prostaciclina, anch'essa sostanza vasodilatante NO-indipendente, è prodotta dall'endotelio a partire dall'acido arachidonico per mezzo dell'enzima ciclossigenasi; tuttavia la sua azione sul tono vasomotore sembra essere di scarso rilievo rispetto ai suoi principali effetti antiaggreganti piastrinici <sup>[15]</sup>.

Tra le sostanze vasocostrittrici di origine endoteliale si annoverano l'endotelina-1, il trombossano  $A_2$ , la prostaglandina  $H_2$  e i ROS <sup>[12, 16]</sup>, cui va aggiunta la capacità da parte della superficie endoteliale di convertire l'angiotensina I in angiotensina II <sup>[17, 18]</sup>. Gli effetti di tali sostanze non si



esauriscono alla sola azione vasocostrittrice, ma includono anche l'azione di rimodellamento strutturale sulla parete arteriosa.

I vasodilatatori ed i vasocostrittori di origine endoteliale, inoltre, sembrerebbero rispettivamente inibire ed attivare ulteriori meccanismi (aggregazione piastrinica, adesione dei monociti, proliferazione e migrazione delle cellule muscolari lisce vasali, espressione di molecole di adesione, rimodellamento vasale) implicati nella genesi e nell'evoluzione dei processi aterosclerotico e trombotico. La capacità dell'organismo di regolare e stabilire un fine equilibrio nella produzione di queste sostanze sembrerebbe di cruciale importanza per il mantenimento dell'omeostasi cardiovascolare ed un'alterazione di tale funzione potrebbe modificare non solo il tono vascolare, ma anche avviare i meccanismi di danno endoteliale che portano all'aterosclerosi e quindi ad eventi cardiovascolari maggiori<sup>[10]</sup>.

Molteplici sostanze chimiche, oltre quelle di origine endoteliale, sono in grado di modulare il tono vasomotore e la funzione endoteliale: alcune ad azione agonista diretta, come la sostanza P, la bradichinina, la serotonina e l'acetilcolina, altre

interagendo con specifici recettori localizzati sulla membrana cellulare, come estrogeni, VEGF e TNF $\alpha$ .

A questo complesso sistema di regolazione di natura chimico-umorale, si affianca quello di natura meccanica rappresentato dallo *shear stress*, cioè quella forza di scivolamento tangenziale generata dal flusso ematico sulla parete endoteliale. Le cellule endoteliali risultano particolarmente sensibili a questo tipo di forza e, attraverso complessi *pathway* intracellulari di meccano-trasduzione, riescono a rispondere a tale stimolo mediante la produzione di sostanze biochimiche in grado di modificare il tono vascolare, l'espressione genica e la struttura endoteliale <sup>[19, 20]</sup>. Lo *shear stress* induce un aumento della produzione di NO attraverso la fosforilazione della eNOS <sup>[21]</sup>; in questo modo, il lume endoteliale può rapidamente modulare il proprio diametro in base alle caratteristiche del flusso ematico che varia in rapporto ai cambiamenti della portata cardiaca.

E' stato dimostrato, inoltre, che l'esposizione cronica a questo tipo di stimolo meccanico attiva maggiormente la produzione di NO mediante la dissociazione della caveolina-1 dall'enzima e l'attivazione della via di trasduzione Akt-mediata,

che è quella principalmente implicata nella regolazione della funzione endoteliale <sup>[22]</sup>. Quindi lo *shear stress* sembra regolare in maniera non solo acuta, ma anche cronica, la funzione vascolare mediante la produzione di fattori vasoattivi autocrini e paracrini capaci di mediare la vasodilatazione endoteliale, il rimodellamento strutturale e l'espressione di diversi geni ad azione vasoprotettiva.

L'efficacia dello stimolo meccanico dato dallo *shear stress* dipende in larga misura dal tipo di flusso, dalla viscosità ematica e dalla struttura vasale. In particolare, l'azione vasoprotettiva è evidente in condizioni fisiologiche di flusso laminare e di endotelio illeso; quando tali parametri vengono a mancare lo *shear stress* diminuisce contribuendo alla genesi della disfunzione endoteliale; ciò accade in caso di flusso turbolento o bifasico presente a livello di biforcazioni, placche ateromasiche ed in distretti ad alterata perfusione.

Il processo aterosclerotico risulta essere strettamente associato alla alterata azione dello *shear stress*, dal momento che l'assenza dello stimolo meccanico determina una riduzione della funzione endoteliale per mezzo della ridotta attività dell'enzima

eNOS, della maggiore espressione di geni proinfiammatori e proaterogeni, della ridotta riparazione del danno endoteliale <sup>[23]</sup>.

Considerando l'importanza dell'azione protettiva dello *shear stress* sulla funzione endoteliale, sembra evidente come gli effetti di una regolare e moderata attività fisica, che si associa ad un miglioramento del flusso ematico e dell'emodinamica sistemica, possano prevenire lo sviluppo del processo aterosclerotico e, più in generale, delle patologie cardiovascolari <sup>[24]</sup>.

Da queste evidenze risulta chiaro che la normale funzione endoteliale gioca un ruolo centrale nell'omeostasi vascolare; in particolare, la produzione dell'ossido nitrico e delle numerose sostanze di derivazione endoteliale costituiscono un complesso e fine sistema protettivo della parete vascolare nei confronti dei maggiori fattori di rischio cardiovascolare che, qualora sovvertito, conduce allo sviluppo di aterosclerosi e trombosi <sup>[10]</sup>.

La diminuita produzione di NO altera non solo la regolazione del tono vasomotore, ma anche quei molteplici meccanismi che controllano la produzione di fattori pro- ed anti-

aterogeni. Un tale squilibrio determina la prevalenza di sostanze, quali endoperossidi, endotelina-1, angiotensina II ed altre, che favoriscono l'attivazione dei processi di danno endoteliale.

È stato infatti dimostrato che l'aumentata incidenza di eventi cardiovascolari maggiori in pazienti affetti da malattia coronarica, arteriopatia periferica, malattia cerebrovascolare ed, in generale, in pazienti ad alto rischio, è significativamente associata ad uno stato di severa disfunzione endoteliale.

Pertanto, la regolazione vascolare endotelio-mediata sembrerebbe essere da sola un indicatore indipendente di eventi cardiaci e cardiovascolari in genere <sup>[25,26,27,28, 29, 30]</sup>.

Diversi metodi sono stati sviluppati, nel corso degli anni, per la valutazione della funzione endoteliale in vivo.

Il metodo dell'avambraccio isolato e perfuso costituisce uno dei primi sistemi che consiste nell'infusione arteriosa, mediante cannulazione dell'arteria brachiale, di sostanze agoniste ed antagoniste endoteliali mentre la risposta vascolare all'infusione delle sostanze test viene valutata attraverso la pletismografia a strain-gauge <sup>[31]</sup>. Accanto a questa procedura

invasiva, ne è stata sviluppata un'altra basata sulle metodiche ecografiche ColorDoppler: la Flow Mediated Dilation (FMD) <sup>[32, 33]</sup>. Tale tecnica consiste nell'indurre una breve ischemia (di solito della durata di 5 minuti) a livello dell'avambraccio per mezzo di un manicotto pneumatico e, successivamente, misurare le variazioni di calibro dell'arteria brachiale conseguenti alla vasodilatazione post-ischemica. L'aumento del calibro vasale indotto dal flusso ematico varia dallo 0 al 15%, pertanto è necessaria una maggiore accuratezza metodologica ed un elevato numero di soggetti per poter ridurre al minimo gli errori di calcolo <sup>[34]</sup>. Tuttavia, la non invasività della tecnica, la rende facilmente eseguibile e, soprattutto, accettabile da parte dei soggetti. La FMD è di solito impiegata per lo studio dei vasi periferici, in particolare delle grosse arterie di conduttanza come l'arteria brachiale <sup>[34, 35]</sup> o, più raramente, l'arteria radiale <sup>[34]</sup>; per lo studio dei vasi di resistenza, invece, la pletismografia su avambraccio isolato e perfuso risulta fornire risultati più attendibili <sup>[36]</sup>. Grazie allo sviluppo di tali tecniche, nell'ultimo decennio è stato possibile ampliare le conoscenze sulla reattività

vascolare e sul ruolo dell'endotelio nella modulazione del tono vasomotore <sup>[37]</sup>.

Come precedentemente ribadito, la disfunzione endoteliale risulta essere il *primum movens* dei meccanismi patogenetici che portano all'aterosclerosi, una patologia infiammatoria in cui il sistema immunitario svolge parte attiva nella genesi e nella progressione del danno vascolare <sup>[2]</sup>. Numerose evidenze hanno ormai chiarito il ruolo svolto da linfociti, monociti-macrofagi, neutrofili e citochine in tale processo infiammatorio <sup>[1]</sup>, ma mai nessuno studio ha indagato la possibile funzione delle immunoglobuline circolanti nella determinazione del profilo di rischio cardiovascolare. L'obiettivo del nostro studio è proprio quello di chiarire se le immunoglobuline abbiano qualche ruolo nella regolazione della funzione endoteliale ed attraverso quali meccanismi possano agire a tale livello. Particolarmente rilevante a questo proposito è stata l'identificazione sulle cellule endoteliali degli *Fcγ-receptors* (FcγRs), recettori specifici per il frammento fc delle immunoglobuline. Questa famiglia di recettori è costituita da numerosi membri che si differenziano in base alla diversa affinità

per le IgG ed in base all'attività inibitoria o attivatoria svolta sui *pathways* intracellulari <sup>[38, 39, 40]</sup>. Tuttavia, non è chiaro se e quale ruolo viene svolto da questi recettori nella regolazione della funzione endoteliale ed eventualmente nella prevenzione dell'aterosclerosi.

I pazienti affetti da Immunodeficienza Comune Variabile (CVID) costituiscono un modello ideale per analizzare questo aspetto, dal momento che tale patologia determina un deficit della produzione anticorpale.

La CVID, infatti, è un'immunodeficienza primaria ad eziologia sconosciuta caratterizzata da un'incapacità maturativa della cellula B, da cui deriva il fallimento della differenziazione in plasmacellule con conseguente deficit di produzione di tutte le classi anticorpali <sup>[41, 42]</sup>. I linfociti B, dunque, vengono prodotti normalmente e sono presenti nel siero dei pazienti in numero fisiologico, pur presentando anomalie fenotipiche <sup>[43]</sup>; invece, le immunoglobuline sieriche (di tipo IgG, IgM, IgA) sono fortemente ridotte a livelli inferiori ai 300 mg/dL. Oltre al deficit anticorpale, sono state evidenziate anche anomalie del compartimento cellulare T, ridotta proliferazione linfocitaria in



risposta a mitogeni ed antigeni, diminuita produzione o espressione di interleuchina-2 e altre citochine <sup>[42, 44]</sup>. La CVID è la seconda immunodeficienza primaria per prevalenza, dopo il Deficit di IgA; essa si manifesta con una frequenza di 1:10000 – 1:50000, generalmente in età adulta intorno alla seconda- terza decade di vita, anche se sono state osservate forme più precoci o più tardive (forme late-onset intorno alla quinta decade) <sup>[45, 46, 47]</sup>.

Nella maggior parte dei casi, la patologia si presenta in maniera sporadica, mentre in una percentuale di soggetti compresa tra il 10 e il 25% è caratterizzata da trasmissione familiare con tratto autosomico dominante o autosomico recessivo. La presentazione clinica dell'Immunodeficienza Comune Variabile è estremamente eterogenea, tanto che è possibile considerarla come una vera e propria sindrome clinica; l'esordio della patologia è caratterizzato da un'aumentata suscettibilità alle infezioni, e solo una minoranza di pazienti, circa il 4,6%, risulta essere asintomatica al momento della diagnosi.

Le più frequenti manifestazioni cliniche includono infezioni respiratorie ricorrenti, patologie gastrointestinali,

infiltrazioni granulomatoze, malattie autoimmuni ed un'aumentata incidenza di neoplasie [48, 49, 50, 51, 52, 53, 54].

Da uno studio prospettico multicentrico italiano eseguito su una coorte di 224 pazienti per un periodo di 11 anni [55], emerge che la principale comorbilità nei pazienti affetti da CVID è costituita dalle infezioni sia acute che croniche, in particolare quelle dell'apparato respiratorio (come polmoniti, sinusiti ed otiti) presenti sia al momento della diagnosi che durante il follow-up. I germi piogeni (pneumococco, Haemophilus influenzae, ecc.) sono i principali agenti eziologici delle infezioni del tratto respiratorio, in cui la più frequente complicanza è rappresentata dalle bronchiectasie. Le patologie autoimmuni riguardano invece dal 20 al 50% dei pazienti con CVID, senza alcuna differenza di incidenza per sesso e per età, come normalmente ci si aspetterebbe. Le manifestazioni autoimmuni più frequenti sono quelle di tipo ematologico come l'anemia emolitica, la porpora trombocitopenica autoimmune, la trombocitopenia idiopatica (Sindrome di Evans) [53], che sembrano ben controllate con terapia corticosteroidica e/o splenectomia. Meno frequenti, ma pur presenti, sono l'artrite

reumatoide, la sindrome secca, il lupus eritematoso sistemico, le tiroiditi, la vitiligo e la malattia celiaca. L'apparato gastrointestinale risulta particolarmente interessato da infezioni virali (epatiti) e batteriche (gastriti da *H.pylori*), da infestazioni intestinali sostenute da *Giardia Lamblia* e da enteropatie protido-disperdenti, che portano a fenomeni di malassorbimento e conseguente malnutrizione. Inoltre, come sopra ricordato, i pazienti affetti da CVID sono caratterizzati da un aumentato rischio di sviluppare neoplasie, di cui quelle più frequenti sono costituite dai linfomi di Hodgkin e Non-Hodgkin e da adenocarcinomi del tratto gastrointestinale. Non infrequenti in tali pazienti sono anche le patologie granulomatose e linfoproliferative benigne, probabilmente associate ad una concomitante disregolazione della funzione dei linfociti T e dei macrofagi <sup>[52]</sup>. Alla diagnosi di Immunodeficienza Comune Variabile si giunge attraverso un'accurata anamnesi, sulla base dell'ipogammaglobulinemia riscontrata al quadro proteico elettroforetico, mediante l'approfondimento diagnostico dato da ulteriori indagini strumentali e, soprattutto, con l'esclusione di tutte le altre possibili cause di ipogammaglobulinemia. Tale

patologia è attualmente trattata con terapia sostitutiva, che consiste nella somministrazione di immunoglobuline umane aspecifiche e polivalenti per via endovenosa (IVIG) alla dose di 300-400 mg pro kilo ogni 3-4 settimane. Tra i principali effetti collaterali immediati dell'infusione vi sono l'emicrania, la meningite asettica, le reazioni flogistiche nel sito di iniezione, le reazioni anafilattoidi e lo shock anafilattico; gli effetti tardivi sono rappresentati, invece, da complicanze trombotiche ed ematologiche, complicanze renali e cardiovascolari. In alcuni casi è possibile ridurre le reazioni avverse mediante lo screening dei pazienti con deficit di IgA, la regolazione del flusso durante l'infusione, la premedicazione ed il controllo sugli emoderivati.

L'efficacia di questo regime terapeutico è ormai stata dimostrata ampiamente e, grazie all'introduzione della terapia sostitutiva con IVIG, è stato possibile ottenere non solo un miglioramento della qualità della vita, ma anche una riduzione della mortalità di questi pazienti [56, 57, 58, 59]. Oltre alla terapia sostitutiva, il trattamento prevede anche una terapia di supporto basata principalmente sull'antibioticoterapia profilattica ed etiologica mirata e sulla fisioterapia (in particolare, nei casi

di infezioni respiratorie recidivanti). Le conoscenze attuali sull'Immunodeficienza Comune Variabile riguardano numerosi ambiti della patologia: la modalità d'esordio, le possibili complicanze, le principali comorbidità, l'efficacia del trattamento [48-56]; tuttavia, mai nessuno studio ha finora indagato il possibile profilo di rischio cardiovascolare in tali pazienti, pur sapendo che il sistema immunitario svolge parte attiva nel processo aterosclerotico [60, 61, 62].

Gli obiettivi del nostro studio sono proprio quelli di approfondire questo aspetto nei pazienti ipogammaglobulinemici affetti da CVID e definire in che modo tale patologia possa alterare o meno la funzione endoteliale. Il secondo obiettivo, inoltre, è quello di chiarire se la terapia sostitutiva con IVIG possa modificare in maniera acuta la reattività endoteliale. Infine, per indagare al meglio il possibile ruolo diretto delle immunoglobuline circolanti sulla normale funzione cardiovascolare, abbiamo predisposto un approfondimento sperimentale su colture di cellule endoteliali umane incubate in vitro sia con albumina che con IVIG e, successivamente, saggiate per le variazioni nella produzione di ossido nitrico.

Lo scopo di quest'ultima procedura è quello di definire se le immunoglobuline aspecifiche polivalenti contenute nell'IVIG siano capaci di generare una reazione diretta della cellula endoteliale ed, in particolare, se tali molecole anticorpali abbiano un ruolo chiave nella modulazione del tono vasale mediante l'induzione della produzione di NO da parte dell'endotelio.

## **II. MATERIALI E METODI**

### **1. Studio in vivo**

Studio della funzione endoteliale in pazienti affetti da Immunodeficienza Comune Variabile (CVID).

#### **a) SOGGETTI**

Presso l'ambulatorio del Prof. Giuseppe Spadaro del Dipartimento di Medicina Interna e Patologia Clinica diretta dal Prof. Gianni Marone dell'Università Federico II di Napoli, sono stati reclutati 35 pazienti affetti da Immunodeficienza Comune Variabile (CVID), 18 maschi e 17 femmine, di cui 10 con CVID di nuova diagnosi mai sottoposti a terapia sostitutiva (gruppo CVID-NT) e 25 già sottoposti a trattamento con IVIG (gruppo CVID-IVIG). Inoltre, sono stati selezionati 17 soggetti sani come gruppo di controllo (gruppo HC).

La diagnosi di CVID è stata posta seguendo i criteri standardizzati ESID/PAGID <sup>[63]</sup>.

Dallo studio sono stati esclusi: i pazienti che per motivi clinici necessitavano di infusioni di IVIG ad intervalli inferiori a 3 settimane; pazienti con diagnosi di neoplasia o con patologie infiammatorie croniche specifiche; pazienti con infezioni in atto o sottoposti a terapia antibiotica e/o antinfiammatoria; pazienti in trattamento con terapia sostitutiva per via sottocutanea, che richiede somministrazioni bisettimanali.

Tutti i partecipanti sono stati informati circa le procedure sperimentali ed i rischi legati allo studio, in modo da poter sottoscrivere liberamente un consenso informato.

Il protocollo sperimentale è stato approvato dal Comitato Etico dell'Università Federico II di Napoli.

## **b) PROCEDURE SPERIMENTALI**

La valutazione della funzione endoteliale è stata effettuata in tutti i soggetti mediante la misurazione con tecnica ecografica della vasodilatazione post-ischemica



(FMD) e dopo nitroglicerina sublinguale (NMD) secondo le linee guida internazionali <sup>[64]</sup>. I soggetti del gruppo CVID-IVIG sono stati valutati dopo cinque settimane dall'ultima infusione di IVIG.

Sia i pazienti (gruppi CVID-IVIG e CVID-NT) che i soggetti di controllo (gruppo HC) hanno effettuato prelievi venosi per esami ematochimici specifici al fine di valutare sia il profilo biochimico che infiammatorio in condizioni basali, e sono stati studiati per FMD e NMD in condizioni di digiuno ( $T_0$ ). Dopo le valutazioni basali, i pazienti del gruppo CVID-IVIG hanno praticato la terapia infusionale con IVIG. Il giorno successivo e dopo la prima, la seconda e la terza settimana dall'infusione IVIG (tempi  $T_1$ ,  $T_2$ ,  $T_3$  e  $T_4$ , rispettivamente) i pazienti del gruppo CVID-IVIG hanno praticato nuovamente i prelievi venosi, i test FMD ed NMD. La Fig.1 illustra schematicamente il protocollo sperimentale seguito per i pazienti del gruppo CVID-IVIG.

La valutazione della reattività vascolare è stata studiata in tutti i soggetti con la tecnica ultrasonografica

della FMD. L'intera procedura è stata eseguita in accordo con le linee guida della *International Brachial Artery Reactivity Task Force* <sup>[64]</sup>, utilizzando un sistema ad ultrasuoni ad alta risoluzione (Toshiba Applio XG, Tokyo, Japan) dotato di un trasduttore lineare multifrequenza a 7,5 MHz. I test sono stati eseguiti in una stanza silenziosa con temperatura controllata intorno ai 22-24 °C, in cui i pazienti sono stati fatti accomodare ed invitati a giacere in posizione supina per circa 15 minuti, così da raggiungere una condizione di equilibrio emodinamico. Dopo aver connesso gli elettrodi per il monitoraggio elettrocardiografico ed aver posizionato un bracciale da sfigmomanometro al braccio destro distalmente alla fossa antecubitale, si è passati alla rilevazione ultrasonografica dell'arteria brachiale (con la sonda posizionata sull'asse longitudinale, 3-5 cm prossimalmente alla fossa antecubitale). La prima valutazione consiste nella misurazione basale del diametro dell'arteria brachiale (BAD) e della velocità di flusso ematico; successivamente, è stato gonfiato il bracciale fino a raggiungere una

pressione di 250 mmHg e, dopo 5 minuti, è stato sgonfiato rapidamente in modo da indurre iperemia reattiva. In questo modo è stato possibile misurare la vasodilatazione endotelio-dipendente (FMD) attraverso la determinazione del massimo incremento del BAD durante la fase iperemica. Nei primi 15 secondi dalla desufflazione del bracciale, è stata misurata la velocità di picco del flusso ematico, dopodiché sono state registrate immagini seriate dell'arteria brachiale per i successivi 3 minuti. Per la valutazione dell'NMD, ai pazienti è stata somministrata una dose sublinguale di 0,3 mg di nitroglicerina spray; successivamente, sono state acquisite immagini dell'arteria brachiale per circa 4 minuti. L'esecuzione della procedura è stata affidata ad un operatore esperto e le immagini digitalizzate sono state immagazzinate in formato DICOM su supporti CD-ROM.

L'infusione di IVIG è stata effettuata secondo le procedure standard, che prevedono la somministrazione mensile di 400 mg/kg di peso corporeo di Immunoglobuline umane normali al 5% in ambiente

ospedaliero in regime di Day-Hospital. L'infusione è stata praticata con un dispositivo a doppia via LIFE CARE 5000 (Abbott), con una velocità iniziale di 10 ml/h, successivamente incrementata del 50% ogni 15 minuti, ad una velocità massima di 80 ml/h. I soggetti non hanno praticato nessuna pre-medicazione anti-istaminica e/o corticosteroidica prima dell'infusione.

### c) CALCOLI

La determinazione del BAD è stata effettuata a fine diastole (coincidente con l'onda R del tracciato ECG) mediante la misurazione della distanza tra l'interfaccia intima-lume della parete prossimale e l'interfaccia media-avventizia della parete distale. L'FMD è stata calcolata secondo la seguente formula:

$$\text{FMD} = \frac{100 \times (\text{BAD al picco iperemico} - \text{BAD basale})}{\text{BAD basale}}$$

ed è stata espressa come incremento percentuale del BAD a partire dal livello basale.

#### **d) ANALISI STATISTICA**

I valori dell'FMD basale dei pazienti di nuova diagnosi (CVID-NT) e dei pazienti già trattati (CVID-IVIG) sono stati confrontati con quelli dei controlli sani (HC) mediante test al t di Student con correzione di Holm per confronti multipli. I valori di immunoglobuline circolanti, dell'FMD e NMD dopo l'infusione di IVIG rispetto ai valori basali sono stati confrontati utilizzando l'ANOVA per misure ripetute ed il test di Dunnett. La significatività statistica è stata fissata ad un valore di  $p < 0.05$ . Tutti i dati sono espressi come media  $\pm$  errore standard.

#### **e) RISULTATI**

La tabella I riporta i dati clinici dei soggetti studiati, in cui risulta chiaro che i livelli plasmatici di IgG del gruppo CVID-IVIG dopo 5 settimane di wash-out farmacologico non sono significativamente differenti da quelli dei soggetti CVID-NT.

I dati relativi alla valutazione della FMD in condizioni basali, sia dei soggetti CVID che di quelli di controllo, sono mostrati in Fig.2. L'istogramma mostra come la funzione endoteliale dei soggetti CVID-NT sia significativamente depressa rispetto al gruppo dei soggetti sani ( $6.3 \pm 1.0 \%$  e  $9.4 \pm 0.9 \%$ , rispettivamente,  $p=0.018$ ). Lo stesso vale per i soggetti CVID-IVIG, la cui FMD risulta compromessa rispetto ai controlli sani e non dissimile da quella dei pazienti CVID-NT ( $7.6 \pm 0.6 \%$ ,  $p=0.048$  vs HC e  $p=NS$  vs CVID-NT). La valutazione NMD non ha dimostrato differenze significative tra i gruppi (dati non mostrati).

I pazienti del gruppo CVID-IVIG sono stati avviati alle procedure sperimentali secondo il protocollo illustrato schematicamente in Fig.1.

La Fig.3 mostra l'andamento dei livelli sierici di IgG nei pazienti trattati (CVID-IVIG). Come da aspettative, i livelli di IgG sono aumentati dopo l'infusione IVIG, mostrando concentrazioni significativamente

maggiori rispetto ai valori basali ai tempi T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> (p<0.05 vs il valore basale).

L'andamento dei valori FMD prima e dopo terapia sostitutiva con IVIG nel gruppo CVID-IVIG è mostrato in Fig.4. Tali valori risultavano aumentati in modo significativo sia 24 ore che una settimana dopo l'infusione di immunoglobuline circolanti ( $10.4 \pm 0.7$  % e  $10.1 \pm 0.6$  %, p=0.004 e p=0.003, rispettivamente). L'FMD, invece, ritornava ai valori basali dopo due e tre settimane dall'infusione ( $8.0 \pm 0.5$  % e  $7.4 \pm 0.6$  % rispettivamente). L'NMD non mostrava variazioni dopo terapia infusiva.

## 2) *Studio in vitro*

Valutazione della produzione di NO in colture di cellule endoteliali umane incubate con immunoglobuline umane aspecifiche e polivalenti (IVIG).

## **a) MODELLI SPERIMENTALI**

Per le procedure sperimentali in vitro sono state utilizzate cellule endoteliali isolate da arterie coronarie umane indenni (HCAEC: Human Coronary Artery Endothelial Cells) e cellule endoteliali di vena ombelicale (HUVEC). Tali cellule sono state crioconservate e successivamente messe in coltura.

Le cellule HCAEC rappresentano dei candidati ideali per lo studio delle funzioni e del metabolismo della cellula endoteliale.

Le HCAEC sono state acquistate da Cambrex Bio Science (Walkersville, MD, USA), e cresciute in mezzo EGM-2 con fattori di crescita per le cellule endoteliali ed il 10% FBS. Le cellule sono state usate ai passaggi da 2 a 5<sup>[65]</sup>.

Le HUVEC sono state cresciute in mezzo EGM-2 supplementato con BBE (Bovine Brain Extract), hEGF, Hydrocortisone, GA-1000 (Gentamicin, Amphotericin-B),



VEGF, hFGF-B, R<sup>3</sup>-IGF-1, Acido Ascorbico, Eparina ed FBS al 2% (Cambrex BioScience). Le HUVEC sono state usate ai passaggi tra 3 e 8 <sup>[66]</sup>.

Al fine di investigare gli effetti delle IgG policlonali sulla attività della eNOS, le cellule sono state mantenute 18h in mezzo senza siero e poi trattate con IgG o con albumina come controllo negativo.

## **b) PROCEDURE SPERIMENTALI**

Le cellule suddivise in due gruppi sono state trattate con: il primo (gruppo IVIG) con dosi crescenti di immunoglobuline IVIG; il secondo (gruppo ALB), di controllo, è stato stimolato con dosi equimolari di albumina (ALB).

Per misurare le variazioni dei livelli di NO, abbiamo utilizzato il DAF-FM diacetato (4-ammino-5-metilammino-2',7'-difluorofluoresceina diacetato) prima dell'aggiunta di IVIG ed albumina alle colture di HCAEC. Tale sostanza diffonde liberamente attraverso le

membrane plasmatiche e, se entra in contatto con NO, viene modificata chimicamente. Il DAF-FM diacetato rappresenta un ottimo reagente per l'analisi quantitativa di basse concentrazioni di NO; esso infatti, nella sua forma di estere, non emette alcuna fluorescenza ed è in grado di attraversare liberamente la membrana cellulare. All'interno della cellula, in seguito alla reazione delle esterasi citosoliche, emette un debole segnale di fluorescenza che risulta essere notevolmente incrementato dopo la reazione con l'NO endogeno, dal momento che quest'ultimo porta alla formazione di un derivato stabile della fluoresceina.

Successivamente, per l'analisi quantitativa del segnale di fluorescenza, è stato utilizzato un citofluorimetro.

La concentrazione di IVIG che ha mostrato determinare il *plateau* nella produzione di NO, simile alle concentrazioni ematiche ottenute in vivo, è stata poi testata sullo stesso tipo di cellule ed è stata valutata al citofluorimetro ai minuti 0, 5, 15, 30 e 60 dopo

l'incubazione. Per ciascuna concentrazione di immunoglobuline o albumina, tale misura è stata espressa come rapporto tra numero di cellule positive per NO al citofluorimetro rispetto al basale.

E' noto che la produzione di NO in risposta allo shear stress è mediata dalla fosforilazione della eNOS Akt-dipendente <sup>[67]</sup>. Al fine di valutare se le IVIG possono indurre attivazione di eNOS, abbiamo stimolato le cellule HUVEC con IgG policlonali (15 mg/ml) per valutare i livelli di fosforilazione della eNOS. Abbiamo utilizzato come controllo positivo la bradichinina alla concentrazione di  $10^{-10}$  M. Al fine di saggiare il coinvolgimento di Akt nella attivazione della eNOS dopo stimolo con IgG abbiamo effettuato un Western Blot con anticorpi anti-fosfo-Akt ed anti-Akt.

### **c) RISULTATI**

Il grafico della Fig. 5 mostra come, nella popolazione cellulare testata con IVIG, la produzione di NO aumenti

rispetto ai valori basali ( $p < 0.05$  alle concentrazioni di 10, 15 e 20 mg/ml di IVIG). Nelle colture cellulari saggiate con albumina, la produzione di NO è pressoché nulla e rimane invariata anche all'aumentare della concentrazione testata.

La Fig. 6 evidenzia l'andamento della produzione di NO da parte delle cellule nei minuti successivi al test con IVIG. La concentrazione di IVIG saggiata è stata quella di 15 mg/ml, visto che nell'esperimento precedente ha dimostrato determinare il picco di produzione di NO. L'ossido nitrico prodotto risulta aumentare nel tempo in maniera statisticamente significativa rispetto ai valori basali ( $p < 0.005$  ai minuti 15, 30 e 60 dopo IVIG). Tale cinetica di reazione mostra una risposta precoce (già dai primi 15 minuti); questo dato conferma i risultati ottenuti nello studio in vivo, in cui la reattività vascolare dei pazienti CVID-IVIG valutata all'FMD migliorava già in fase acuta rispetto all'infusione di immunoglobuline (picco a 24 ore dalla somministrazione di IVIG).

La fosforilazione della eNOS è un meccanismo chiave per la produzione di NO in risposta a vari stimoli <sup>[5]</sup>. Abbiamo valutato se le IVIG (15 mg/ml) possono indurre attivazione di eNOS nelle cellule HUVEC. Dopo la stimolazione, le cellule sono state raccolte a tempi differenti (0-60 min), come indicato in Fig.7, lisate e sottoposte a Western Blot con anticorpi anti-fosfo-eNOS ed anti-eNOS. Come mostrato in figura 7, le IgG policlonali inducono una significativa fosforilazione della eNOS dopo 5 min e fino ad 1 ora di incubazione.

Abbiamo saggiato il coinvolgimento di Akt nella attivazione della eNOS mediante Western Blot con anticorpi anti-fosfo-Akt ed anti-Akt. Come mostrato in figura 7, le HUVEC non mostravano fosforilazione basale di Akt. Al contrario, le IgG policlonali inducevano una fosforilazione massiva di Akt.

### III. DISCUSSIONE

L'integrità della funzione endoteliale è ormai ritenuta una condizione necessaria affinché l'omeostasi cardiovascolare possa mantenersi entro un *range* fisiologico. Si è ampiamente dimostrato come alterazioni di tale funzione costituiscano l'evento principale nella patogenesi del processo aterosclerotico, in cui la disregolazione della risposta immunitaria e l'iperespressione di molecole di adesione rivestono un ruolo cruciale.

Il presente studio ha mostrato che una difettiva produzione anticorpale in pazienti con ICV si associa a un peggioramento della funzione endoteliale e che l'infusione di IgG umane polivalenti determina un rapido miglioramento della stessa.

Numerosi studi hanno valutato le possibili complicanze infettive, autoimmunitarie e neoplastiche della CVID, ma mai nessuna valutazione è stata effettuata circa il possibile impatto del deficit anticorpale sul profilo di rischio cardiovascolare, nonostante sia ampiamente conosciuto il ruolo del sistema immunitario nella progressione del danno vascolare <sup>[60, 61, 62]</sup>. È

opportuno però chiarire che il miglioramento della qualità della vita e l'aumento della sopravvivenza di tali pazienti rappresentano dei risultati recenti grazie soprattutto all'introduzione della terapia sostitutiva con IVIG. Precedentemente all'introduzione di questo schema terapeutico, i pazienti con COVID presentavano frequenti complicanze infettive, autoimmunitarie e/o tumorali che non di rado conducevano all'*exitus* in età precoce. Pertanto, vista la breve sopravvivenza, questi pazienti non avevano il tempo di sviluppare un insulto cronico che potesse minare l'integrità dell'apparato cardiovascolare. Attualmente, se da un lato il trattamento sostitutivo ha raggiunto l'importante obiettivo dell'aumento della sopravvivenza, dall'altro ha fatto in modo che si realizzi la possibilità di un incremento del rischio cardiovascolare. I dati emersi dal nostro studio suggeriscono proprio la tendenza alla progressione verso l'aterosclerosi: oltre ad una ridotta vasodilatazione indotta dal flusso, i nostri pazienti mostravano anche un aumentato spessore intima-media all'esame ecografico dei tronchi sovraortici (dati non mostrati).

Tuttavia, l'infusione di immunoglobuline umane polivalenti ai nostri pazienti ha determinato, già in fase acuta, un miglioramento della reattività vascolare allo *shear stress* e, di conseguenza, della funzione endoteliale stessa. Quest'aspetto ha importanti implicazioni sul piano clinico in quanto, anticipare il timing di questo intervento terapeutico, avrebbe un forte impatto protettivo verso lo sviluppo del danno endoteliale e del rischio cardiovascolare in genere.

I risultati raggiunti dal nostro studio in vivo hanno però suscitato ulteriori quesiti riguardanti soprattutto i possibili meccanismi d'azione delle immunoglobuline circolanti nella modulazione della funzione endoteliale. A tale scopo è stato allestito il protocollo sperimentale in vitro, che ci ha permesso di dimostrare l'azione diretta delle immunoglobuline circolanti sulla cellula endoteliale e di chiarirne il meccanismo d'azione, che consiste nella stimolazione della produzione endoteliale di NO mediante la fosforilazione della eNOS Akt-dipendente.

Alla luce della dimostrazione dell'azione diretta delle immunoglobuline sulla cellula endoteliale, abbiamo ipotizzato una possibile interazione del frammento Fc con gli *Fcγ-receptors*



(FcγRs) posti sulla membrana cellulare <sup>[38, 39, 40]</sup>. Questa famiglia di recettori è costituita da numerosi membri che si differenziano in base alla diversa affinità per le IgG ed in base all'attività inibitoria o attivatoria svolta sui *pathways* intracellulari. In virtù di queste conoscenze, sembrerebbe probabile il loro ruolo nella stimolazione della produzione di NO da parte della cellula endoteliale.

I dati presenti in letteratura, fanno emergere dei ruoli contrastanti svolti dalle immunoglobuline: se da un lato promuovono la risposta proinfiammatoria in processi autoimmunitari o nella risposta cellulo-mediata dell'immunità innata contro vari microrganismi; dall'altra rappresentano un efficace trattamento antinfiammatorio per numerose patologie autoimmuni. Da quanto detto, si evince che le azioni mediate dalle IgG possono essere molteplici e svolgersi a più livelli nei vari distretti dell'organismo. Inoltre, risulta chiaro quanto ancora ci sia da scoprire circa tutti i possibili meccanismi cellulari e molecolari mediati dalle immunoglobuline circolanti; tuttavia, la dimostrazione di una chiara azione antinfiammatoria e della

capacità di migliorare la funzione endoteliale rappresenta una rilevante evidenza, soprattutto per il possibile impatto clinico.

In conclusione, il nostro studio dimostra che le immunoglobuline circolanti esercitano un potente effetto sulla regolazione della produzione di NO in vivo nell'uomo. Inoltre, dimostriamo che tale effetto è direttamente legato alla stimolazione delle cellule endoteliali, come indicato dagli studi in vitro. Infine, i nostri dati indicano che le IgG sono in grado di attivare la eNOS con conseguente produzione di NO attraverso l'attivazione di AKT. Pertanto, è possibile ipotizzare che le IgG circolanti possano esercitare, in aggiunta alle numerose funzioni anti-infettive e antiinfiammatorie, anche un importante e non ancora chiarito ruolo nella prevenzione dell'aterosclerosi. I dati ottenuti aprono un nuovo ed interessante spiraglio con potenziale importante sviluppo delle relazioni fra aterosclerosi ed immunità umorale.

## IV. BIBLIOGRAFIA

1. Galkina E, Ley K. Immune and Inflammatory Mechanism of Atherosclerosis. *Annu Rev Immunol*. 2009; 27: 165-197;
2. Hansson GK. Immune Mechanism in Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001; 21:1876-1890;
3. Petty RG, Pearson JD. Endothelium--the axis of vascular health and disease. *J R Coll Physicians Lond*. 1989; 23:92-102;
4. Rubanyi GM. The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1993; 22 Suppl 4:S1-14;
5. Förstermann U, Münzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease. From marvel to menace. *Circulation*. 2006; 113: 1708-1714;

6. Fellet AL, Arza P, Arreche N, Arranz C, Balaszczuk AM. Nitric oxide and thyroid gland: modulation of cardiovascular function in autonomic-blocked anaesthetized rats. *Exp Physiol*. 2004; 89: 303-312;
7. Lloyd-Jones DM, Bloch KD. The vascular biology of nitric oxide and its role in atherogenesis. *Annu Rev Med*. 1996; 47:365-75;
8. Li JR, Billiar TR, Talanian RV, et al. Nitric oxide reversibly inhibits seven members of the caspase family via S-nitrosylation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997; 240: 419-424;
9. Stamler JS, Lamas S, Fang FC. Nitrosylation. The prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell*. 2001; 106: 675-683;
10. Celermajer DS. Endothelial dysfunction: does it matter? Is it reversible? *J Am Coll Cardiol*. 1997; 30: 325-33;

11. Casas JP, Bautista LE, Humphries SE, et al. Endothelial nitric oxide synthase genotype and ischemic heart disease. Meta-analysis of 26 studies involving 23028 subjects. *Circulation*. 2004; 109: 1359-1365;
12. Lusher TF, Vanhoutte PM. The endothelium: modulator of cardiovascular function. *Boca Raton, FL: CRC Press*. 1990; 1-215;
13. Busse R, Edwards G, Félétou M, Fleming I, Vanhoutte PM, Weston AH. EDHF: bringing the concepts together. *Pharmacol Sci*. 2002; 23: 374-380;
14. Halcox JP, Narayanan S, Cramer-Joyce L, Mincemoyer R, Quyyumi AA. Characterization of endothelium-derived hyperpolarizing factor in the human forearm microcirculation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001; 280: H2470-7;

15. Moncada S, Higgs EA, Vane JR. Human arterial and venous tissues generate prostacyclin (prostaglandin x), a potent inhibitor of platelet aggregation. *Lancet*. 1977; 1:18-20;
16. Katusic ZS, Vanhoutte PM. Superoxide anion is an endothelium-derived contracting factor. *Am J Physiol*. 1989; 257: H33-7;
17. Saye JA, Singer HA, Peach MJ. Role of endothelium in conversion of angiotensin I in angiotensin II in rabbit aorta. *Hypertension*. 1984; 6: 216-221;
18. Kinlay S, Behrendt D, Wainstein M, et al. Role of endothelin-1 in the active constriction of human atherosclerotic coronary arteries. *Circulation*. 2001; 6: 216-221;
19. Davies PF. Hemodynamic shear stress and the endothelium in cardiovascular pathophysiology. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2009; 6: 16-26;

20. World CJ, Garin G, Berk B. Vascular shear stress and activation of inflammatory genes. *Curr Atheroscler Rep.* 2006; 8: 240-244;
21. Corson MA, James NL, Latta SE, Nerem RM, Berk BC, Harrison DG. Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circ Res.* 1996; 79: 984-91;
22. Boyd NL, Park H, Yi H, et al. Chronic shear stress induces caveolae formation and alters ERK and Akt responses in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003; 285: H1113-H1122;
23. Cunningham KS, Gotlieb AI. The role of shear stress in the pathogenesis of atherosclerosis. *Lab Investigation.* 2005; 85: 9-23;

24. Sessa WC, Pritchard K, Seyedi N, et al. Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric-oxide production and endothelial-cell nitric-oxide synthase gene-expression. *Circ Res.* 1994; 74: 349-353;
25. Targonski PV, Bonetti PO, Pumper GM, et al. Coronary endothelial dysfunction is associated with an increased risk of cerebrovascular events. *Circulation.* 2003; 107: 2805-9;
26. Gokce N, Keaney JF Jr, Hunter LM, et al. Risk stratification for postoperative cardiovascular events via noninvasive assessment of endothelial function: a prospective study. *Circulation.* 2002; 105: 1567-72;
27. Heitzer T, Schilnzig T, Krohn K, et al. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation.* 2001; 104: 2673-8;



28. Halcox JP, Schenke WH, Zalos G, et al. Prognostic value of coronary vascular endothelial dysfunction. *Circulation*. 2002; 106: 653-8;
29. Suwaidi JA, Hamasaki S, Higano ST, et al. Long-term follow up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation*. 2000; 101: 948-5;
30. Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation*. 2000; 101: 1899-1906;
31. Higashi Y, Yoshizumi M. New methods to evaluate endothelial function: method for assessing endothelial function in humans using a strain-gauge plethysmography: nitric oxide-dependent and -independent vasodilation. *J Pharmacol Sci*. 2003; 93: 399-404;

32. Byström S, Jensen B, Jensen-Urstad M, Lindblad LE, Kilbom A. Ultrasound-Doppler technique for monitoring blood flow in the brachial artery compared with occlusion plethysmography of the forearm. *Scand J Clin Lab Invest.* 1998; 58: 569-76;
33. Napoli R, Apuzzi V, Bosso G, et al. Recombinant human thyrotropin enhances endothelium-mediated vasodilation of conduit arteries. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009; 94: 1012–1016;
34. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol.* 2002; 39: 257-65;
35. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, Lloyd JK, Deanfield JE. Non-

invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet*. 1992; 340:1111-5;

36. Joannides R, Haefeli WE, Linder L, et al. Nitric Oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation*. 1995; 91: 1314-9;
37. Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, et al. Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *J Am Coll Cardiology*. 1995; 26: 1235-41;
38. Sedmak DD, Davis DH, Singh U, van de Winkel JG, Anderson CL. Expression of IgG receptor antigens in placenta and on endothelial cells in humans. An immunohistochemical study. *Am J Pathol*. 1991; 138: 175–181;
39. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2008; 8: 34-47;

40. Burton DR, Woof JM. Human antibody effector function. *Adv Immunol.* 1992; 51: 1-84.
41. Cunningham-Rundles C. Common variable immunodeficiency. *Curr Allergy Rep.* 2001; 1: 421-9;
42. Cunningham-Rundles C, Bodian C. Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients. *Clin Immunol.* 1999; 92: 34-48;
43. Saiki O, Ralph P, Cunningham-Rundles C, et al. Three distinct stages of B-cell defects in Common Varied Immunodeficiency. *Proc Natl Acad Sci.* 1982; 27: 308-316;
44. Bryant A, Calver N, Toubi E, et al. Classification of patients with Common Variable Immunodeficiency by B-cell Secretion of IgM and IgG response to anti-IgM and Interleukin-2. *Clin Immunol Immunopathol.* 1990; 56: 239-48;

45. Hausser C, Virelizier JL, Buriot D, Griscelli C. Common variable hypogammaglobulinemia in children. Clinical and immunologic observations in 30 patients. *Am J Dis Child*. 1983; 137: 833-7;
46. Conley ME, Park CL, Douglas SD. Childhood common variable immunodeficiency with autoimmune disease. *J Pediatr*. 1986; 108: 915-22;
47. Hermans PE, Diaz-Buxo JA, Stobo JD. Idiopathic late-onset immunoglobulin deficiency. Clinical observations in 50 patients. *Am J Med*. 1976; 61: 221-37;
48. Hermaszewski RA, Webster AD. Primary hypogammaglobulinaemia: a survey of clinical manifestations and complications. *Q J Med*. 1993; 86: 31-42;
49. Buehring I, Friedrich B, Scaaf J, et al. Chronic sinusitis refractory to standard management in patients with humoral immunodeficiencies. *Clin Exp Immunol*. 1997; 109: 468–472;

50. Kainulainen L, Varpula M, Liippo K, et al. Pulmonary abnormalities in patients with primary hypogammaglobulinemia. *J Allergy Clin Immunol*. 1999; 104: 1031-6;
51. Kalha I, Sellin JH. Common variable immunodeficiency and the gastrointestinal tract. *Curr Gastroenterol Rep*. 2004; 6: 377-83;
52. Mechanic LJ, Dikman S, Cunningham-Rundles C. Granulomatous disease in common variable immunodeficiency. *Ann Intern Med*. 1997; 127: 613-7;
53. Wang J, Cunningham-Rundles C. Treatment and outcome of autoimmune hematologic disease in common variable immunodeficiency (CVID). *J Autoimmun*. 2005; 25: 57-62;
54. Kersey JH, Spector BD, Good RA. Primary immunodeficiency diseases and cancer: the

immunodeficiency-cancer registry. *Int J Cancer*. 1973; 12: 333-47;

55. Quinti I, Soresina A, Spadaro G, et al. Long term follow-up and outcome of a large cohort of patients with Common Variable Immunodeficiency. *J Clin Immunol*. 2007; 27: 308-16;

56. Skull S, Kemp A. Treatment of hypogammaglobulinemia with intravenous immunoglobulins. *Arch Dis Child*. 1996; 74: 527-530;

57. Quinti I, Pierdominici M, Marziali M, et al. European surveillance of immunoglobulin safety, result of initial survey of 1243 patients with primary immunodeficiencies in 16 countries. *Clinical Immunology*. 2002; 104: 231-236;

58. Busse PJ, Razvi S, Cunningham-Rundles C. Efficacy of intravenous immunoglobulin in the prevention of pneumonia

in patients with common variable immunodeficiency. *Journal Allergy Clinical Immunology*. 2002; 109: 1001-1004;

59. Quartier P, Debrè M, De Blic J, et al. Early and prolonged intravenous immunoglobulin therapy in childhood agammaglobulinemia: a retrospective survey of 31 patients. *Journal Pediatric*. 1999; 134: 589-596;

60. Rattazzi M, Faggin E, Bertipaglia B, Pauletto P. Innate immunity and atherogenesis. *Lupus*. 2005;14: 747-51;

61. Packard RRS, Lichtman AH, Libby P. Innate and adaptive immunity in atherosclerosis. *Semin Immunopathol*. 2009; 31: 5-22;

62. Matsuura E, Kobayashi K, Inoue K, Shoenfeld Y. Intravenous immunoglobulin and atherosclerosis. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2005; 29: 311-9;



63. Conley ME, Notarangelo LD, Etzioni A. Diagnostic criteria for primary immunodeficiencies: representing PAGID (Pan-American Group for Immunodeficiency) and ESID (European Society for Immunodeficiency). *Clin Immunol.* 1999; 93: 190-197;
64. Coretti MC, Anderson TJ, Benjamin D, Celermajer F, Charbonneau F, Creager MA, et al. International brachial artery reactivity task force. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol.* 2002; 39: 257-265;
65. Cirillo P, De Rosa S, Pacileo M, Gargiulo A, Angri V, Fiorentino I, et al. Human urotensin II induces tissue factor and cellular adhesion molecules expression in human coronary endothelial cells: an emerging role for urotensin II in cardiovascular disease. *J Thromb Haemost.* 2008; 6(5):726-36;

66. Bala K, Ambwani K, Gohil NK. Effect of different mitogens and serum concentration on HUVEC morphology and characteristics: implication on use of higher passage cells. *Tissue Cell*. 2011; 43(4):216-22.
67. Shiojima I, Walsh K. Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis. *Circ Res*. 2002; 90(12):1243-50;

## **V. LEGENDA DELLE FIGURE**

### **Figura 1.**

Disegno sperimentale dello studio nei soggetti in trattamento sostitutivo (CVID-IVIG).

### **Figura 2.**

Funzione endoteliale in condizioni basali nei soggetti di controllo (HC), nei pazienti affetti da CVID mai trattati (CVID-NT) e nei pazienti precedentemente trattati con IVIG (CVID-IVIG).

### **Figura 3.**

Livelli sierici di IgG nei pazienti CVID-IVIG sottoposti a terapia sostitutiva valutati al Tempo 0 (5 settimane dopo l'ultima infusione di IVIG), dopo 24 ore ( $T_1$ ) e dopo 1, 2 e 3 settimane ( $T_2$ ,  $T_3$  e  $T_4$ ) dall'infusione endovenosa di IgG policlonali aspecifiche (IVIG). Le linee tratteggiate in verde ed in blu

rappresentano rispettivamente i valori basali di IgG nei controlli (HC) e nei pazienti non trattati (CVID-NT).

#### **Figura 4.**

Funzione endoteliale nei pazienti del gruppo CVID-IVIG misurata al Tempo 0 (5 settimane dopo l'ultima infusione di IVIG), dopo 24 ore ( $T_1$ ) e dopo 1, 2 e 3 settimane ( $T_2$ ,  $T_3$  e  $T_4$ ) dall'infusione endovenosa di IgG policlonali aspecifiche (IVIG). Le linee tratteggiate in verde ed in blu rappresentano rispettivamente i valori basali dell'FMD nei controlli (HC) e nei pazienti non trattati (CVID-NT).

#### **Figura 5.**

Produzione in vitro di NO per dosi a concentrazioni crescenti di IVIG (linea blu) e di albumina (linea rossa). La produzione di ossido nitrico aumenta progressivamente all'aumentare delle concentrazioni di IVIG e raggiunge valori statisticamente significativi rispetto al basale per concentrazioni di 10,15 e 20 mg/ml ( $p < 0.005$ ).

### **Figura 6.**

Produzione in vitro di NO saggiata per la concentrazione di 15mg/ml di IVIG a partire dal Tempo 0 e fino a 60 minuti dopo il test. L'aumentata produzione di ossido nitrico raggiunge valori statisticamente significativi già 15 minuti dopo la determinazione basale e si mantiene tale nei successivi 45 minuti ( $p < 0.005$ ).

### **Figura 7.**

Attivazione del pathway di segnale di Akt e della eNOS nelle HUVEC indotta dalle IgG policlonali. I lisati cellulari totali sono stati preparati a differenti tempi dopo stimolazione con IgG policlonali (poly IgG) or Albumin (NT). I blot sono stati saggiati con anticorpi diretti verso le forme fosforilate e verso le proteine totali. La tubulina è stata usata per la normalizzazione.

## VI. TABELLE

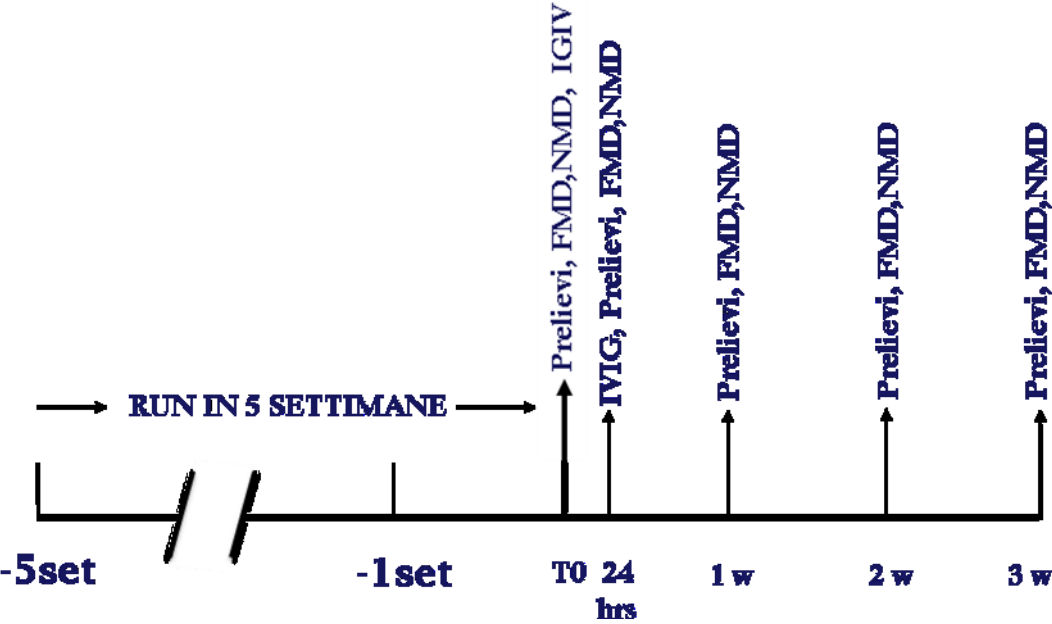
**Tabella I.** Caratteristiche cliniche dei soggetti studiati.

	ETÀ (Anni)	BMI (kg/cm <sup>2</sup> )	FC bpm	PAM mmHg	COL TOT mg/dl	IgG g/L
<b>HC</b> n=17	40±5	25.2±0.3	68±2	91.48±5	197.7±16	9.2±0.7
<b>CVID-NT</b> n=10	41±5	24.5±0.1	67±2	86.3±5	181.4±8	4.3±0.4*
<b>CVID-IVIG</b> n=25	45±3	26±0.8	73±3	89.06±2	171.7±8	5.7±1.8*

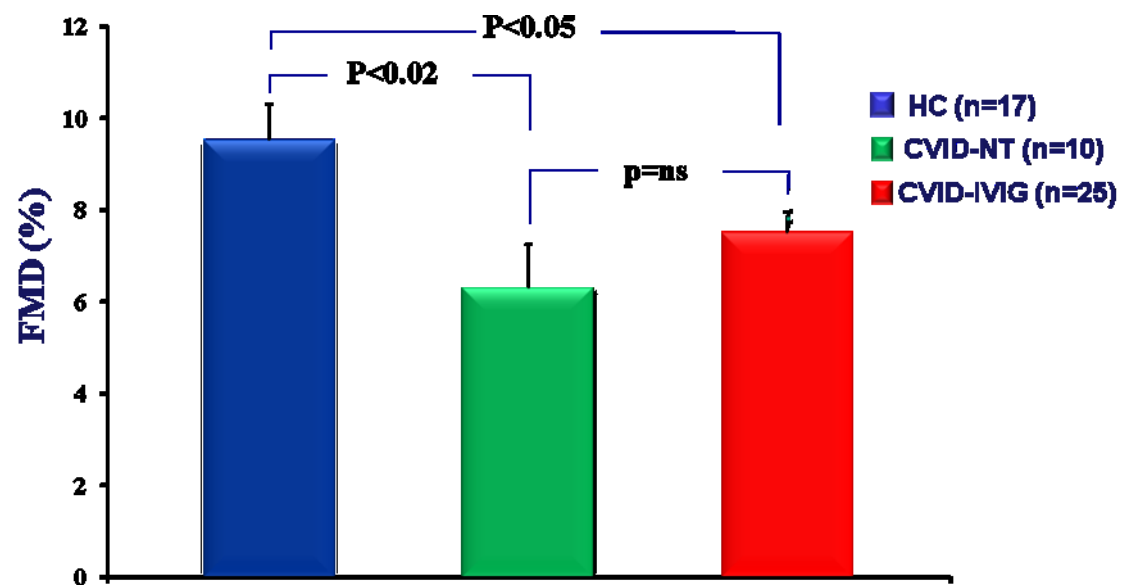
\*p ≤ 0.05 vs HC

**VII. FIGURE**

**Figura 1.**

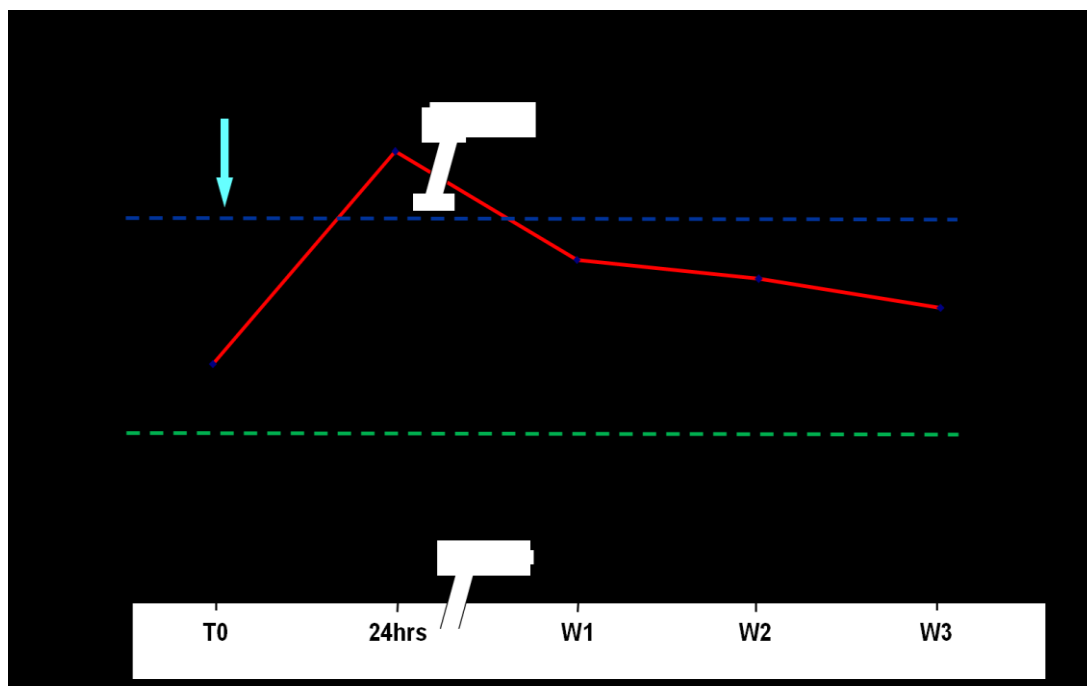


**Figura 2.**

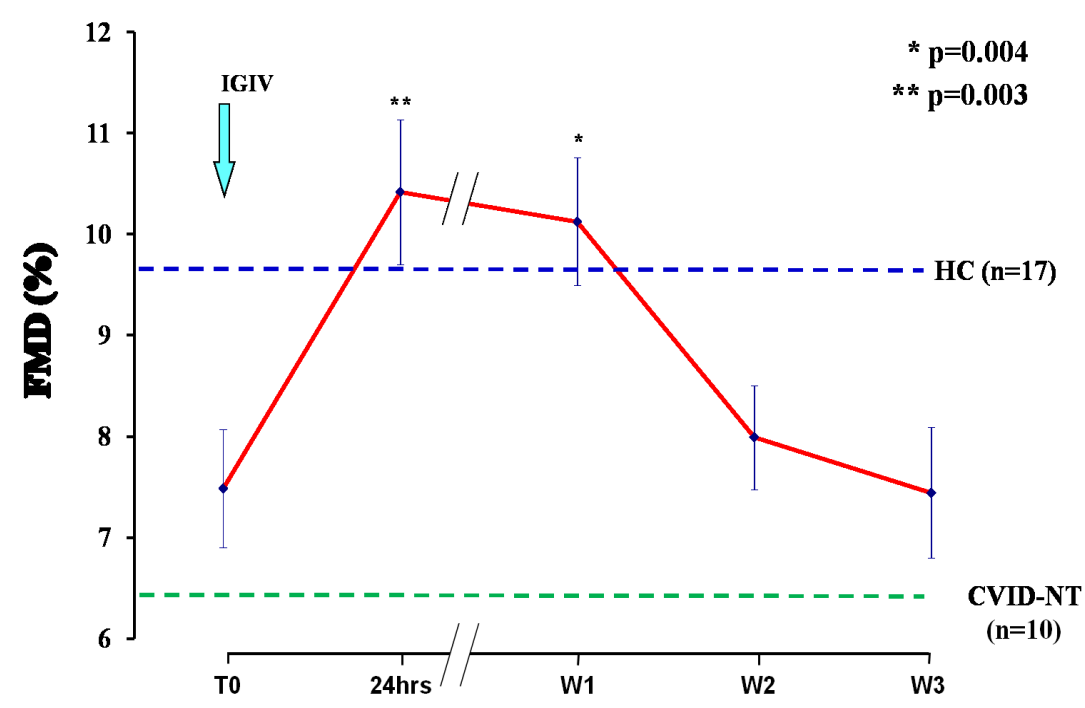




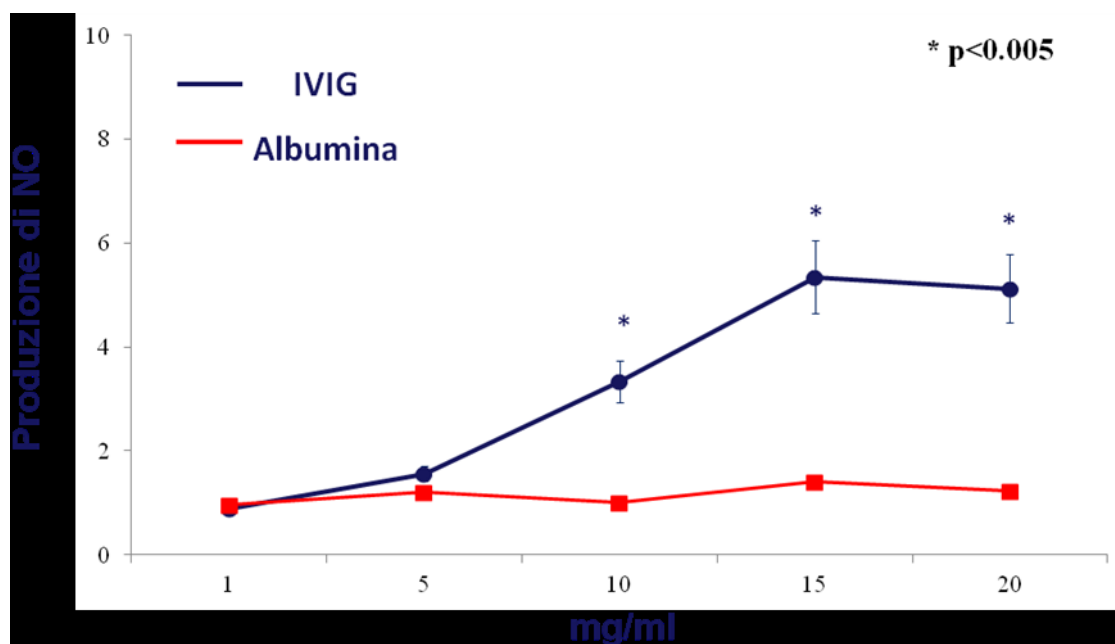
**Figura 3.**



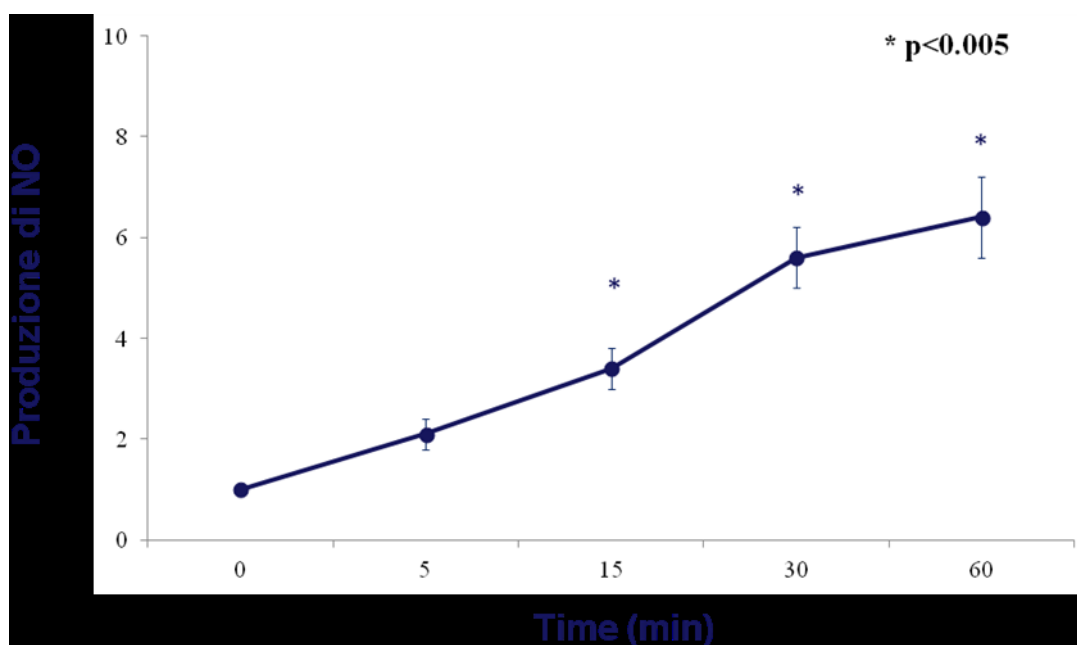
**Figura 4.**



**Figura 5.**



**Figura 6.**



**Figura 7.**

